

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

I, ADRIAN PAUL BROWN, M.A., M.C.I.L., M.I.T.I., declare

1. That I am a citizen of the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, residing at 5 Gilbert Road, London, SE11 4NZ.
2. That I am well acquainted with the French and English languages.
3. That the attached is a true translation into the English language of the certified copy of French Patent Application No. 03 09697 filed on 6th August 2003.
4. That all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements are made with the knowledge that wilful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such wilful false statements may jeopardise the validity of the patent application in the United States of America or any patent issuing thereon.

DECLARED THIS 6th DAY OF DECEMBER 2005



A P BROWN

REST AVAILABLE COPY



NATIONAL INSTITUTE
FOR INDUSTRIAL
PROPERTY

IAP20 Rec'd PCT/PTO 31 JAN 2006

PATENT OF INVENTION

UTILITY CERTIFICATE - CERTIFICATE OF ADDITION

OFFICIAL COPY

The Director General of the National Institute for Industrial Property certifies that the attached document is the true certified copy of an application for an Industrial Property Right filed at the Institute.

Issued in Paris, 02 JUNE 2004

For the Director General of the
National Institute for Industrial Property,
The Head of the Patents Division

(signature)

Martine PLANCHE

HEAD OFFICE

NATIONAL
INSTITUTE FOR
INDUSTRIAL
PROPERTY

NATIONAL PUBLIC INSTITUTION

DB 267/220104

26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Telephone: 33 (0)1 53 04 53 04
Facsimile: 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

CREATED BY LAW NO. 51-444 OF 19th APRIL 1951

INPI

NATIONAL
INSTITUTE FOR
INDUSTRIAL PROPERTY
26bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Telephone: 33 (1) 53 04 53 04
Facsimile: 33 (1) 42 94 86 54

**PATENT OF INVENTION
UTILITY CERTIFICATE
Intellectual Property Code - Book VI**

cerfa
No. 11354*03

PA1

REQUEST FOR GRANT

page 1/2

Reserved for INPI

This form is to be completed legibly in black ink DB 540 @ W /210502

Completion of Page 2 is obligatory.

INPI

NATIONAL
INSTITUTE FOR
INDUSTRIAL PROPERTY

**PATENT OF INVENTION
UTILITY CERTIFICATE**

REQUEST FOR GRANT
page 2/2

PA2

Reserved for INPI

DEPOSITION OF DOCUMENTS	
DATE 6 AUGUST 2003	
PLACE 75 INPI PARIS	
NATIONAL REGISTRATION NO. GIVEN BY THE INPI 0309697	

DB 540 W /210502

6 AUTHORISED AGENT (where applicable)		
Surname		KUEHM-CAUBERE
Forename		Catherine
Practice or company		LES LABORATOIRES SERVIER
No. of standing power of attorney and/or of contractual bond		
Address	Street	12, Place de la Défense
	Postal code and town	9 2 4 1 5 COURBEVOIE Cedex
	Country	FRANCE
Telephone no. (optional)		01.55.72.60.00
Facsimile no. (optional)		01.55.72.72.13
E-mail address (optional)		
7 INVENTOR(S)		The inventors are necessarily natural persons.
The Applicants and the inventors are the same		<input type="checkbox"/> Yes <input checked="" type="checkbox"/> No : In this case, complete the "Declaration of Inventorship" form
8 SEARCH REPORT		For a patent application only (including division and conversion)
immediate drawing up or deferred drawing up		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Staggered payment of fees (in two instalments)		Only for natural persons filing their own Application themselves <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
9 REDUCTION IN FEES		For natural persons only <input type="checkbox"/> Requested for the first time for this invention (attach a notice of non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtained prior to this deposit for this invention (attach a copy of the admissibility decision for free waiver or indicate its reference): FA
10 NUCLEOTIDE AND/OR AMINO ACID SEQUENCES		<input checked="" type="checkbox"/> Mark the box if the description contains a list of sequences
The electronic data carrier is attached The declaration that the sequence list on paper carrier agrees with the electronic data carrier is attached.		<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
If you have used the "Continuation" form, indicate the number of pages attached		
11 SIGNATURE OF THE APPLICANT OR OF THE AUTHORISED AGENT (Name and position of signatory)		STAMP OF THE PREFECTURE OR OF THE INPI
[signature] Catherine KUEHM-CAUBERE, Patent Engineer		[signature]

INPI

NATIONAL
INSTITUTE FOR
INDUSTRIAL PROPERTY
26bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Telephone: 33 (1) 53 04 53 04
Facsimile: 33 (1) 42 94 86 54

PATENT OF INVENTION
UTILITY CERTIFICATE
Intellectual Property Code - Book VI

cerfa
No. 11354*03

PA/Continuation

REQUEST FOR GRANT
Continuation Page 1/1

Reserved for INPI

DEPOSITION OF DOCUMENTS	
DATE 6 AUGUST 2003	
PLACE 75 INPI PARIS	
NATIONAL REGISTRATION NO.	
GIVEN BY THE INPI	0309697

This form is to be completed legibly in black ink

DB 829 @ W / 010702

Your references for this file (optional)		PEPTIDE-1
4 DECLARATION OF PRIORITY OR REQUEST FOR THE BENEFIT OF THE FILING DATE OF A PRIOR FRENCH APPLICATION		Country or organisation Date No. Country or organisation Date No. Country or organisation Date No.
5 APPLICANT (Mark one of the 2 boxes)		<input checked="" type="checkbox"/> Legal person <input type="checkbox"/> Natural person
Surname or company name		HYBRIGENICS
Forenames		
Legal nature		
SIREN No.		
APE-NAF Code		
Domicile or registered office	Street	3-5, impasse Reille
	Postal code and town	7 5 0 1 4 PARIS
	Country	FRANCE
Nationality		FRENCH
Telephone no. (optional)		
Facsimile no. (optional)		
E-mail address (optional)		
5 APPLICANT (Mark one of the 2 boxes)		<input type="checkbox"/> Legal person <input checked="" type="checkbox"/> Natural person
Surname or company name		
Forenames		
Legal nature		
SIREN No.		
APE-NAF Code		
Domicile or registered office	Street	
	Postal code and town	
	Country	
Nationality		
Telephone no. (optional)		
Facsimile no. (optional)		
E-mail address (optional)		
11 SIGNATURE OF THE APPLICANT OR OF THE AUTHORISED AGENT (Name and position of signatory)		STAMP OF THE PREFECTURE OR OF THE INPI
[signature] Catherine KUEHM-CAUBERE, Patent Engineer		[signature]

The present invention relates to a new peptide interacting with Bcl-XL and Bcl-2, and also to screening methods allowing identification of compounds that are capable of modifying that interaction.

5 Most biological processes involve protein-protein interactions. One of the goals set by proteomics is to produce a map of those interactions. By virtue of their being involved in most signal transduction mechanisms, these interactions are targets of choice in the development of a medicament.

● There are numerous methodologies which allow protein interactions to be identified. One 10 of the most widespread is the two-hybrid system initially developed and described by Fields *et al.* (US 5,283,173; US 5,468,614; US 5,667,973).

This system basically consists of an *in vitro* test between two recombined proteins. The first of these, known as the "bait" protein, is a chimeric protein fused to a DNA binding domain (BD) capable of binding upstream of a reporter gene. The binding domains commonly used are those of Gal4 or *E.coli* LexA.

15 The second protein is also a chimeric protein, commonly known as the "prey", which contains an activation domain (AD), generally coming from Gal4.

However, those conventional methods have their limitations. It is well known, for example, that such screening methods can result in false positives and/or false negatives, and biochemical confirmations of the results obtained are necessary.

20 A more effective technique allowing false positives or negatives to be minimised is described in the patent application WO9942612 and uses recombinant haploid yeasts containing the "bait" and "prey" polypeptides. This system allows detection of a greater number of "preys" using one "bait" in a more precise, more reproducible and more sensitive manner than the other conventional methods used in the field.

25 Apoptosis is a process of cell death that plays a crucial role in multicellular organisms. There are, in fact, two forms of cell death: necrosis and apoptosis. Necrosis is found in the case of tissue lesions: the cells swell, leading to release of the cellular contents and then to lysis of the cell, causing inflammation of the surrounding tissues.

Apoptosis, on the other hand, is a physiological process which is programmed and regulated and the importance of which cannot be underestimated because about 10^9 of our cells die by this mechanism every day. Numerous pathologies are linked to deregulation of the equilibrium that exists between cell growth, survival and death.

5 There may be mentioned, in particular, autoimmune diseases, certain neurological disorders and cancers.

10 Keeping a cell alive or programming its death requires at least ten families of different proteins, among which the Bcl-2 family plays a major role. This family comprises about twenty proteins, including Bcl-2 and Bcl-XL, which are anti-apoptotic proteins favouring survival of the cell, as opposed to Bax, Bak and Bid, which are pro-apoptotic proteins. In the course of apoptosis it would seem that the members of the Bcl-2 family modify their interactions with their partners so as to cause irreversible changes in the cell leading to cell death.

15 It is accordingly essential to be able to identify compounds capable of modifying those interactions in order to obtain real candidate medicaments that are efficacious in pathologies involving deregulation of apoptosis, especially autoimmune diseases, certain neurodegenerative disorders and cancers.

The Applicants have now identified a new peptide interacting with the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-XL.

20 This short peptide of 22 amino acids corresponds to the precise interaction domain with Bcl-2 and/or Bcl-XL and has the typical structural features of a "BH3" motif, the interaction domain allowing the formation of homo- or hetero-dimers.

25 The small size of this peptide makes it an ideal candidate for developing a test allowing highly efficient screening of compounds that are capable of modifying interactions between those proteins.

5 Numerous tests are found in the literature for screening modifiers of protein-protein interactions but they often have limitations with regard to their sensitivity and their high-throughput feasibility. The methods customarily employed necessitate the use of complex tools (fusion proteins, recombinant proteins etc.), which is not very compatible with high-throughput screening. Very frequently they generate a high level of background noise and are of low reliability from a quantitative point of view: they provide a reduced reading window that does not allow optimum screening of the compounds tested.

10 However, the Applicants have developed a highly efficient screening test based on fluorescence polarisation (Owicki J.C. *et al.*, Journal of Biomolecular Screening, 5, 2000, 297-306). This technique allows, for example, measurement of the interaction between a fluorophore-labelled ligand and a receptor. The principle consists of measuring an increase in the polarisation of fluorescence emitted by the ligand when bound to its receptor compared to that emitted by the free ligand. The fluorescence polarisation of the free ligand is dependent on its molecular weight and will be greater the higher the molecular weight. 15 Accordingly, when this test is carried out using a ligand of high molecular weight, having a high level of intrinsic fluorescence polarisation, it will be difficult to reliably evaluate the difference in fluorescence polarisation between the free ligand and the bound ligand. Using as small a ligand as possible, on the other hand, will allow that difference to be accentuated and consequently allow the precision of the assay to be increased. It will accordingly be 20 possible to better evaluate the real activity of a compound and to carry out high-throughput screenings.

More specifically, the present invention relates to the peptide comprising the sequence of amino acids of Figure 1 (SEQ ID No.1) and to its functional variants.

25 "Functional variants" are understood to be any fragments or point mutants of the peptide described in Figure 1 that are capable of interacting with the proteins Bcl-2 and/or Bcl-XL.

This peptide was identified by the two-hybrid method using Bcl-XL and Bcl-2 as "bait" proteins. Three banks of human cDNA (placenta, brain, cell line CEMC7) were screened

and allowed the identification of "prey" fragments corresponding to partial sequences of the sequence HC21ORF80 (Accession Number NM_015227).

It was then determined experimentally by the two-hybrid technique that a fragment of that sequence is necessary and sufficient to obtain the interaction with Bcl-XL and/or Bcl-2 and
5 corresponds to the fragment of 22 amino acids described in Figure 1.

Interaction with the proteins Bcl-2 and Bcl-XL was validated by biochemical techniques (co-immunoprecipitation, GST pull-down), and it was possible to confirm the biological activity of this peptide by transfections and/or microinjections into cells where it was shown to cause apoptosis.

10 The present invention relates also to sequences of nucleic acids deduced according to the genetic code from the sequence of amino acids of Figure 1, and also to those deduced from the functional variants described hereinbefore.

More specifically, the invention relates to the nucleic acid sequence of Figure 2 (SEQ ID No.2) coding for the peptide described in Figure 1.

15 A "nucleic acid sequence" is to be understood as a nucleic acid sequence isolated from its natural context and in particular denotes sequences that have been isolated, amplified and/or purified and, as the case may, modified by genetic engineering.

The invention relates also to a recombinant vector comprising a nucleic acid sequence according to the invention.

20 A "vector" is to be understood as any type of vector allowing introduction of the nucleic acid sequence into a host cell and expression of the polypeptide.

The recombinant vector according to the invention is characterised in that it comprises DNA sequences necessary for expression of the peptides according to the invention and, more especially, of the peptide described in Figure 1.

25 There may be mentioned, in particular, vectors derived from bacterial plasmids, bacteriophages, yeast plasmids and chromosomes, viruses etc..

The invention relates also to host cells transformed by the recombinant vectors. These cells are preferably bacteria or eukaryotic cells. There may be mentioned, by way of example, *Escherichia coli*, yeasts, insect cells or mammalian cells.

5 The invention relates furthermore to a method of screening agents capable of modifying the interaction between the peptides according to the invention, more especially the peptide described in Figure 1, and anti-apoptotic proteins, more especially Bcl-2 and Bcl-XL. The agents modifying those interactions will advantageously be compounds that have been chemically synthesised or obtained from compound banks.

The screening method according to the invention comprises the following steps :

- 10 a) preparation of a peptide according to the invention labelled with a fluorescent label;
b) incubation with the compound under test;
c) addition of the fusion protein comprising the anti-apoptotic protein;
d) measurement of the fluorescence polarisation.

The invention relates especially to the method of screening compounds capable of inhibiting the interaction between the peptide and the anti-apoptotic protein, comprising the following steps :

- 15 a) preparation of the peptide according to the invention labelled with a fluorescent label;
b) incubation with the compound under test, or not;
c) addition of the fusion protein comprising the anti-apoptotic protein;
d) measurement of the fluorescence polarisation with and without the compound under test;
e) selection of the compounds for which the increase in fluorescence polarisation observed with the compound under test is significantly less than that observed without the compound under test.

The invention relates especially to the method of screening compounds capable of enhancing the interaction between the peptide and the anti-apoptotic protein, comprising the following steps :

- a) preparation of the peptide according to the invention labelled with a fluorescent label;
- b) incubation with the compound under test, or not;
- c) addition of the fusion protein comprising the anti-apoptotic protein;
- d) measurement of the fluorescence polarisation with and without the compound under test;
- e) selection of the compounds for which the increase in fluorescence polarisation observed with the compound under test is significantly greater than that observed without the compound under test.

According to a preferred embodiment of the methods described hereinbefore, the fluorescent label will be, for example, Oregon Green, Bodipy or fluorescein, more especially fluorescein.

The peptide according to the invention used in the screening methods will preferably be the peptide described in Figure 1.

The methods according to the invention will advantageously be carried out using the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-XL.

Consequently, the invention relates also to use of the peptides according to the invention in the screening, according to the methods of the invention, of active compounds capable of modifying apoptosis.

More specifically, the invention relates to use of the peptides according to the invention in the screening, according to the methods of the invention, of compounds that are useful in the treatment of pathologies involving deregulation of apoptosis.

The invention accordingly relates to use of the peptides according to the invention in the screening, according to the methods of the invention, of compounds that are useful in the treatment of autoimmune diseases, certain neurological disorders and cancers.

DESCRIPTION OF THE FIGURES

5 Figure 1 : Amino acid sequence of the peptide interacting with Bcl-2 and Bcl-XL (SEQ ID No.1)

Figure 2 : Nucleic acid sequence coding for the peptide described in Figure 1 (SEQ ID No.2)

The following Examples illustrate the invention without limiting it in any way :

EXAMPLE 1 : Identification of the peptide described in Figure 1

Three banks of human cDNA (placenta, brain, cell line CEMC7) were screened by the two-hybrid technique (Fields *et al.*) in yeast using the conjugation protocol (Legrain *et al.*,
5 Nature Genetics, 1997, 16, 277-282).

1) Preparation of "baits" and "preys"

a) The "baits" used are : - C-terminal truncate of Bcl-XL (1-209) fused to the LexA
DNA binding domain

10 - C-terminal truncate of Bcl-2 (1-211) fused to the LexA
DNA binding domain.

They are expressed in *Saccharomyces cerevisiae* (CG1945 or L40ΔGal4) and precultured at 30°C in a synthetic medium lacking tryptophan (DO-Trp) until a DO_{600nm} of between 0.1 and 0.5 inclusive is obtained. Fifty ml of a dilution of that preculture (DO_{600nm} = 0.006) are incubated at 30°C overnight.

15 b) A collection of yeasts containing the plasmids expressing the cDNA banks, fused to the Gal4 transcription activation domain, is obtained by transformation following selection on a medium lacking leucine (DO-Leu). The yeasts are divided into aliquots and stored at -80°C.

20 2) Conjugation

Conjugation is carried out using a "bait"/"prey" ratio of 2.

An amount of "yeast bait" cells obtained in Step 1)a) corresponding to 50 units of DO_{600nm} is mixed with the "yeast preys" obtained in Step 1)b). After centrifugation, the sediment is resuspended in a YPGlu medium, spread onto YPGlu culture plates and incubated for 4 hours 30 minutes at 30°C. Selection of the conjugated yeasts containing a "bait" and a "prey" capable of interacting with one another is carried out in a
25

DO-Leu-Trp-His medium : the absence of leucine and tryptophan makes it possible to maintain a selection pressure allowing only those yeasts that contain the two types of plasmid ("baits"/"preys") to grow; the absence of histidine from the medium makes it possible to select the conjugated yeasts containing a "bait" plasmid and a "prey" plasmid capable of interacting with one another: this interaction makes it possible to activate the HIS3 gene, which codes for an enzyme involved in the biosynthesis of histidine.

5

3) Identification of positive clones

10

The "prey" fragments of a colony of yeasts selected according to 2) are amplified by PCR starting from a crude lysate of that colony using specific primers of the "prey" vector :

ABS1 5'-GCTTGGAATCACTACAGG-3'

ABS2 5'-CACGATGCACGTTGAAGTG-3'.

15

The PCR products are then sequenced and the sequences obtained are identified by comparison with databases.

Among the positive clones obtained, it was possible to identify fragments of about 300 amino acids as being partial sequences of the sequence HC21ORF80 (Accession Number : NM_015227).

20 4) Identification of the peptide described in Figure 1

25

Two-hybrid experiments carried out according to Steps 1), 2) and 3) described above on smaller fragments of the sequence HC21ORF80 allowed identification of a short peptide of 22 amino acids as being necessary and sufficient to obtain the interaction with Bcl-XL and Bcl-2 : Asp-Thr-Arg-Arg-Ser-Met-Val-Phe-Ala-Arg-His-Leu-Arg-Glu-Val-Gly-Asp-Glu-Phe-Arg-Ser-Arg.

EXAMPLE 2 : Validation of the interaction between the peptide described in Example 1 and Bcl-2 and/or Bcl-XL

1) GST "pull-down"

The interaction between the peptide obtained in Example 1 and Bcl-2 and/or Bcl-XL is
5 validated by measuring the shift in the interaction between a Bid protein having a "BH3" motif and the fusion protein GST-Bcl-2 or GST-Bcl-XL.

a) Synthesis of radiolabelled Bid

The labelled protein is obtained using the TNT Quick Master kit (Promega). Forty µl of TNT mixture are incubated for 90 minutes at 30°C together with 2 µl (equivalent to 10 20 µCi) of ³⁵S-methionine (Amersham), 1 µg of plasmid DNA coding for Bid and a sufficient amount of water to obtain a volume of 50 µl.

The number of fmoles/µl of radioactive protein produced is calculated on the basis of the number of methionines in the protein.

b) GST "pull-down"

Four fmoles of radioactive Bid protein are incubated at 4°C for 3 hours together with 15 3 µg of the fusion protein glutathione-S-transferase-Bcl-XL (GST-Bcl-XL) or glutathione-S-transferase-Bcl-2 (GST-Bcl-2) or GST alone in 300 µl of binding buffer (142mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM Hepes buffer, 0.5mM DTT, 1mM EDTA, protease inhibitor, pH 7.4) and 0.4 % Triton X100. Beads of "Glutathione Sepharose 4 Fast Flow" (Amersham) are washed 3 times in the binding buffer and resuspended in that 20 buffer so as to obtain a 50 % solution. 20 µl are added to each sample and incubated with rotation at 4°C for 1 hour. The beads are then washed 3 times in the binding buffer, and then 25 µl of 2x SDS buffer, Laemmli (Sigma) are added. The samples are then held for 5 minutes at 95°C and then applied to a 12 % Tris-glycine gel (Invitrogen). After electrophoresis, the gel is subsequently incubated in a drying 25 solution (Invitrogen) for 30 minutes and then dried for 150 minutes at 70°C. The radioactive proteins are revealed by exposure to a Kodak BioMax MS-1 film (Sigma).

In order to carry out the competition test with the peptide under test, the latter is added to the initial solution in concentrations ranging from 1 to 100 μ M.

c) Results

When the peptide obtained in Example 1 is added to the initial solution, the autoradiographic signal of Bid disappears. This result shows that the peptide obtained in Example 1 inhibits the interaction between Bcl-2 and Bid and between Bcl-XL and Bid.

2) Fluorescence polarisation

A 1 to 100nM solution of the peptide obtained in Example 1 labelled with fluorescein at the N-terminal end is mixed with a solution containing the fusion protein GST-Bcl-XL or GST-Bcl-2 at a concentration of from 0.1 to 1 μ M in a buffer containing Na₂HPO₄ 20mM pH 7.4, EDTA 1mM, NaCl 50mM, pluronic acid F-68 0.05 %. The fluorescence polarisation is then measured by the En Vision apparatus (Packard Perkin-Elmer).

Results : A significant increase in fluorescence polarisation is observed when the peptide obtained in Example 1 is incubated with the fusion proteins containing Bcl-XL and Bcl-2, demonstrating that it has been bound to these proteins.

EXAMPLE 3 : Screening test for compounds capable of inhibiting the interaction between Bcl-2 and/or Bcl-XL and the peptide obtained in Example 1

The compounds under test are dispensed into 384-well plates (Corning Flat Bottom) at a final concentration of 10 μ g/ml. One well is filled with an equivalent amount of buffer/solvent without the compound under test to form the control. The peptide obtained in Example 1, labelled with fluorescein, is added to each well so as to obtain a final concentration ranging from 1 to 100nM. The fusion protein GST-Bcl-XL or GST-Bcl-2 is then added so as to obtain a final concentration of from 0.1 to 1 μ M in a buffer containing Na₂HPO₄ 20mM pH 7.4, EDTA 1mM, NaCl 50mM and pluronic acid F-68 0.05 %. The

fluorescence polarisation is then measured by the En Vision apparatus (Packard Perkin-Elmer). A significant decrease in the fluorescence polarisation recorded in the test carried out with the test compound compared to that obtained without the test compound (control well) allows the conclusion that the compound possesses inhibitory activity. Conversely, a 5 significant increase in fluorescence polarisation in the test with the test compound compared to the control allows the conclusion that the compound possesses activating activity.

CLAIMS

1. Peptide interacting with the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and/or Bcl-XL, characterised by the following sequence (SEQ ID No.1) : Asp-Thr-Arg-Arg-Ser-Met-Val-Phe-Ala-Arg-His-Leu-Arg-Glu-Val-Gly-Asp-Glu-Phe-Arg-Ser-Arg .

5 2. Peptide, characterised in that it corresponds to a fragment or point mutant of the peptide according to claim 1 and in that it exhibits interaction with the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and/or Bcl-XL.

3. Nucleic acid sequence coding for a peptide according to claim 1, characterised by the following sequence (SEQ ID No.2) :

10 5'-GATAACCGTCGCAGCATGGTGTTCGCCAGGCACCTGCGGGAGGTGGGAGA
CGAGTTCAGGAGCAGA -3'.

4. Nucleic acid sequences deduced according to the genetic code from the amino acid sequence according to claim 1.

15 5. Nucleic acid sequences deduced according to the genetic code from the amino acid sequence according to claim 2.

6. Recombinant vector, characterised in that it comprises a nucleic acid sequence according to one of claims 3 to 5.

7. Recombinant vector according to claim 6, characterised in that the vector is a plasmid comprising the sequences necessary for expression of the peptide in a host cell.

20 8. Host cell, characterised in that it has been transformed by the recombinant vector according to one of claims 6 or 7.

9. Method of identifying compounds capable of modifying the interaction between a peptide according to one of claims 1 or 2 and an anti-apoptotic protein, characterised in that it comprises the following steps:

- a) preparation of a peptide according to one of claims 1 or 2 labelled with a fluorescent label;
- b) incubation with the compound under test;
- c) addition of the fusion protein comprising the anti-apoptotic protein;
- d) measurement of the fluorescence polarisation.

10. Method of identifying compounds capable of inhibiting the interaction between a peptide according to one of claims 1 or 2 and an anti-apoptotic protein, characterised in that it comprises the following steps:

- a) preparation of a peptide according to one of claims 1 or 2 labelled with a fluorescent label;
- b) incubation with or without the compound under test;
- c) addition of the fusion protein comprising the anti-apoptotic protein;
- d) measurement of the fluorescence polarisation;
- e) selection of the compounds for which the increase in fluorescence polarisation observed with the compound under test is significantly less than that observed without the compound under test.

20 11. Method of identifying compounds capable of enhancing the interaction between a peptide according to one of claims 1 or 2 and an anti-apoptotic protein, characterised in that it comprises the following steps:

- a) preparation of a peptide according to one of claims 1 or 2 labelled with a fluorescent label;
- b) incubation with or without the compound under test;
- c) addition of the fusion protein comprising the anti-apoptotic protein;
- d) measurement of the fluorescence polarisation;

e) selection of the compounds for which the increase in fluorescence polarisation observed with the compound under test is significantly greater than that observed without the compound under test.

12. Method according to one of claims 9 to 11, wherein the peptide used is
5 characterised by the sequence SEQ ID No. 1.

13. Method according to one of claims 9 to 11, wherein the fluorescence label used is fluorescein.

14. Method according to one of claims 9 to 11, wherein the anti-apoptotic protein is Bcl-2 or Bcl-XL.

10 15. Use of a peptide according to one of claims 1 or 2 in the identification, according to the method of one of claims 9 to 11, of apoptosis-modifying compounds.

16. Use of a peptide according to one of claims 1 or 2 in the identification, according to the method of one of claims 9 to 11, of compounds that are useful in the treatment of pathologies involving deregulation of apoptosis.

15 17. Use of a peptide according to one of claims 1 or 2 in the identification, according to the method of one of claims 9 to 11, of compounds that are useful in the treatment of autoimmune diseases, certain neurological disorders and cancers.

Figure 1 : Amino acid sequence of the peptide interacting with Bcl-2 and Bcl-XL
(SEQ ID No. 1)

Asp-Thr-Arg-Arg-Ser-Met-Val-Phe-Ala-Arg-His-Leu-Arg-Glu-Val-Gly-Asp-Glu-
Phe-Arg-Ser-Arg

Figure 2 : Nucleic acid sequence coding for the polypeptide described in Figure 1

(SEQ ID No. 2)

**5'-GATACCCGTCGCAGCATGGTGTTCGCCAGGCACCTGCAGGAGGTGGG
AGACGAGTTCAAGGAGCAGA -3'**

Received on 05/09/03

INPI

NATIONAL
INSTITUTE FOR
INDUSTRIAL PROPERTY

PATENT OF INVENTION
UTILITY CERTIFICATE
Intellectual Property Code - Book VI

cerfa
No. 11235*02

PATENTS DIVISION

26bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Telephone: 01 53 04 53 04
Facsimile: 01 42 93 59 30

DECLARATION OF INVENTORSHIP

Page No. 1 / 2

(if the Applicant is not the inventor or not the only inventor)

This form is to be completed legibly in black ink DB 113 W /260899

Your references for this file (optional)	PEPTIDE-1				
NATIONAL REGISTRATION NO.	0309697				
TITLE OF THE INVENTION (maximum 200 characters or spaces) New peptide interacting with Bcl-XL and Bcl-2					
APPLICANT(S): <table><tr><td>LES LABORATOIRES SERVIER 12, Place de la Défense 92415 COURBEVOIE Cedex FRANCE</td><td>HYBRIGENICS 3-5 Impasse Reille 75014 PARIS FRANCE</td></tr></table>				LES LABORATOIRES SERVIER 12, Place de la Défense 92415 COURBEVOIE Cedex FRANCE	HYBRIGENICS 3-5 Impasse Reille 75014 PARIS FRANCE
LES LABORATOIRES SERVIER 12, Place de la Défense 92415 COURBEVOIE Cedex FRANCE	HYBRIGENICS 3-5 Impasse Reille 75014 PARIS FRANCE				
DESIGNATE(S) AS INVENTOR(S) : (Indicate at the top right-hand side "Page No. 1/1". If there are more than three inventors, use an identical form and number each page indicating the total number of pages).					
Surname		GENESTE			
Forenames		Olivier			
Address	Street	11, rue de la Bénarde			
	Postal code and town	92500	RUEIL MALMAISON		
Belonging company (optional)					
Surname		HICKMAN			
Forenames		John			
Address	Street	136, rue de Tocqueville			
	Postal code and town	75017	PARIS		
Belonging company (optional)					
Surname		BENNETT			
Forenames		Richard			
Address	Street	3, rue Saint Christophe			
	Postal code and town	75015	PARIS		
Belonging company (optional)					
DATE AND SIGNATURE(S) OF THE APPLICANT(S) OR OF THE AUTHORISED AGENT (Name and position of signatory)		[signature]			
6 August 2003					
Catherine KUEHM-CAUBERE, Patent Engineer					

Law No. 78-17 of 6 January 1978 relating to information processing, data files and rights applies to the responses made on this form. It guarantees right of access to and correction of the data concerning you at the INPI.

Received on 05/09/03

INPI

NATIONAL
INSTITUTE FOR
INDUSTRIAL PROPERTY

PATENT OF INVENTION
UTILITY CERTIFICATE
Intellectual Property Code - Book VI

cerfa
No. 11235*02

PATENTS DIVISION

26bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Telephone: 01 53 04 53 04
Facsimile: 01 42 93 59 30

DECLARATION OF INVENTORSHIP

Page No. 2 / 2

(if the Applicant is not the inventor or not the only inventor)

This form is to be completed legibly in black ink DB 113 W /260899

Your references for this file (optional)	PEPTIDE-1		
NATIONAL REGISTRATION NO.	0309697		
TITLE OF THE INVENTION (maximum 200 characters or spaces) New peptide interacting with Bcl-XL and Bcl-2			
APPLICANT(S): LES LABORATOIRES SERVIER HYBRIGENICS 12, Place de la Défense 3-5 Impasse Reille 92415 COURBEVOIE Cedex 75014 PARIS FRANCE FRANCE			
DESIGNATE(S) AS INVENTOR(S) : (Indicate at the top right-hand side "Page No. 1/1". If there are more than three inventors, use an identical form and number each page indicating the total number of pages).			
Surname		RAIN	
Forenames		Jean-Christophe	
Address	Street	32, jardin Boieldieu	
	Postal code and town	92800	PUTEAUX
Belonging company (optional)			
Surname			
Forenames			
Address	Street		
	Postal code and town		
Belonging company (optional)			
Surname			
Forenames			
Address	Street		
	Postal code and town		
Belonging company (optional)			
DATE AND SIGNATURE(S) OF THE APPLICANT(S) OR OF THE AUTHORISED AGENT (Name and position of signatory)		[signature]	
6 August 2003			
Catherine KUEHM-CAUBERE, Patent Engineer			

Law No. 78-17 of 6 January 1978 relating to information processing, data files and rights applies to the responses made on this form. It guarantees right of access to and correction of the data concerning you at the INPI.



IAP20 Rec'd PCT/PTO 31 JAN 2006

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

29 NOV. 2005

Fait à Paris, le _____

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Martine PLANCHE', is enclosed in a thin oval border.

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa
N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 e W / 210502

REMISE DES PIÈCES DATE LIEU		Réervé à l'INPI 6 AOUT 2003 75 INPI PARIS	N° attribué par l'INPI 0309697	1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE LES LABORATOIRES SERVIER Direction Brevets 12, Place de la Défense 92415 COURBEVOIE Cedex FRANCE	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		0 6 AOUT 2003			
Vos références pour ce dossier (facultatif) PEPTIDE-1					
Confirmation d'un dépôt par télécopie					
2 NATURE DE LA DEMANDE					
Cochez l'une des 4 cases suivantes					
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>			
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>			
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date	<input type="text"/>	
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		N°	Date	<input type="text"/>	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Nouveau peptide interagissant avec Bcl-XL et Bcl-2					
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE					
Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="text"/>					
Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="text"/>					
Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="text"/>					
<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »					
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)					
<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique					
Nom ou dénomination sociale		LES LABORATOIRES SERVIER			
Prénoms					
Forme juridique					
N° SIREN		<input type="text"/>			
Code APE-NAF		<input type="text"/>			
Domicile ou siège	Rue <input type="text"/>				
	Code postal et ville <input type="text"/> COURBEVOIE Cedex				
	Pays <input type="text"/> FRANCE				
Nationalité		FRANCAISE			
N° de téléphone (facultatif)		01.55.72.60.00	N° de télécopie (facultatif) 01.55.72.72.13		
Adresse électronique (facultatif)					
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »					

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DE PIÈCES	Réervé à l'INPI
DATE	6 AOUT 2003
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0309697
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		KUEHM-CAUBERE
Nom		Catherine
Prénom		LES LABORATOIRES SERVIER
Cabinet ou Société		
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	12, Place de la Défense
	Code postal et ville	9124115 COURBEVOIE Cedex
	Pays	FRANCE
N ° de téléphone (facultatif)	01.55.72.60.00	
N ° de télécopie (facultatif)	01.55.72.72.13	
Adresse électronique (facultatif)		
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt
		<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques
		<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="checkbox"/>
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
 Catherine KUEHM-CAUBERE, Ingénieur Brevets		



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa
N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1

BR/SUITE

REMISE DES PIÈCES	Réervé à l'INPI
DATE	6 AOUT 2003
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0309697
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire DB 829 @ W / 010702

4 DECLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		PEPTIDE-1
		Pays ou organisation Date [] N°
		Pays ou organisation Date [] N°
		Pays ou organisation Date [] N°
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		HYBRIGENICS
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		[]
Code APE-NAF		[]
Domicile ou siège	Rue	3-5, Impasse Reille
	Code postal et ville	75014 PARIS
	Pays	FRANCE
Nationalité		FRANCAISE
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		[]
Code APE-NAF		[]
Domicile ou siège	Rue	
	Code postal et ville	[]
	Pays	
Nationalité		
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
		Catherine KUEHM-CAUBERE, Ingénieur Brevets
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

La présente invention concerne un nouveau peptide interagissant avec Bcl-XL et Bcl-2, ainsi que les méthodes de criblage permettant d'identifier des molécules capables de moduler cette interaction.

La plupart des processus biologiques impliquent des interactions protéines-protéines. Un 5 objectifs fixés par la protéomique est la réalisation d'une carte de ces interactions. Celles-ci, impliquées dans la plupart des mécanismes de transductions de signal, sont des cibles de choix dans l'élaboration d'un médicament.

Il existe de nombreuses méthodologies permettant d'identifier des interactions protéiques. Une des plus répandues est le système du double hybride initialement développée et décrite 10 par Fields et col. (US5,283,173, US5,468,614, US5,667,973).

Ce système consiste à la base en un test *in vitro* entre deux protéines recombinées. La première appelée « protéine appât » est une protéine chimérique fusionnée à un domaine de liaison de l'ADN (DNA binding domain/BD) capable de se lier en amont d'un gène reporter. Les domaines de liaison couramment utilisés sont ceux de Gal4 ou *E.coli LexA*.

15 La seconde protéine est également une protéine chimérique communément appelée « proie » qui contient un domaine d'activation (activation domain/AD), en général provenant de Gal4.

Cependant, ces méthodes conventionnelles ont leurs limites. Il est par exemple bien connu 20 que de tels criblages peuvent conduire à des faux positifs et/ou faux négatifs et des confirmations biochimiques des résultats obtenus sont nécessaires.

Une technique plus performante permettant de minimiser les faux positifs ou négatifs est décrite dans la demande de brevet WO9942612 et utilise des levures haploïdes recombinantes contenant les polypeptides « appât » et « proie ». Ce système permet la détection d'un plus grand nombre de « proies » à partir d'un « appât », de façon plus 25 précise, plus reproductible et plus sensible que les autres méthodes conventionnelles utilisées dans le domaine.

L'apoptose est un processus de mort cellulaire jouant un rôle crucial chez les organismes pluricellulaires. Il existe en effet deux formes de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose. La nécrose se rencontre lors de lésions tissulaires : les cellules gonflent, conduisant à la fuite des constituants cellulaires puis à la lyse de la cellule, ce qui provoque une inflammation des tissus alentours.

Au contraire, l'apoptose est un processus physiologique programmé et régulé, dont on ne peut sous estimer l'importance puisque environ 10^9 de nos cellules meurent tous les jours par ce mécanisme. De nombreuses pathologies sont reliées à une dérégulation de l'équilibre existant entre la croissance, la survie et la mort cellulaire.

On peut citer en particulier les maladies autoimmunes, certaines maladies neurologiques et les cancers.

Maintenir une cellule en vie ou programmer sa mort nécessite au moins dix familles de protéines différentes, parmi lesquelles la famille Bcl-2 joue un rôle majeur. Cette famille contient environ vingt protéines parmi lesquelles Bcl-2 et Bcl-XL, protéines anti-apoptotiques favorisant la survie de la cellule, à l'inverse de Bax, Bak et Bid qui sont des protéines pro-apoptotiques. Au cours de l'apoptose, il semblerait que les membres de la famille Bcl-2 modifient leurs interactions avec leurs partenaires de façon à induire des changements irréversibles dans la cellule conduisant à la mort cellulaire.

Il est ainsi essentiel de pouvoir identifier des molécules capables de modifier ces interactions pour obtenir de réels candidats médicaments efficaces dans les pathologies impliquant des dérégulations de l'apoptose, notamment les maladies autoimmunes, certaines maladies neurodégénératives et les cancers.

La demanderesse a présentement identifié un nouveau peptide interagissant avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL.

Ce petit peptide de 22 acides aminés correspond au domaine précis d'interaction avec Bcl-2 et/ou Bcl-XL et possède les critères structuraux typiques d'un motif « BH3 », domaine d'interaction permettant la formation d'homo- ou d'hétérodimères.

La faible taille de ce peptide en fait un candidat idéal pour l'élaboration d'un test permettant le criblage hautement efficace de molécules capables de moduler les interactions entre ces protéines.

On trouve dans la littérature de nombreux tests de criblage de modulateurs d'interactions 5 protéines-protéines mais ils présentent souvent des limites quant à leur sensibilité et leur faisabilité à haut débit. Les méthodes couramment utilisées nécessitent la mise en œuvre d'outils complexes (protéines de fusion, protéines recombinantes...) peu compatible avec un criblage à haut débit. Elles génèrent le plus souvent un bruit de fond important et sont peu fiables d'un point de vue quantitatif : elles présentent une fenêtre de lecture réduite ne 10 permettant pas un criblage optimal des molécules testées.

La demanderesse a au contraire élaboré un test de criblage hautement efficace basé sur la polarisation de fluorescence (Owicki J.C. et al., Journal of Biomolecular Screening, 5, 2000, 297-306). Cette technique permet par exemple de mesurer l'interaction entre un ligand marqué avec un fluorophore et un récepteur. Le principe consiste à mesurer une 15 augmentation de la polarisation de fluorescence émise par le ligand fixé à son récepteur comparée à celle émise par le ligand libre. La polarisation de fluorescence du ligand libre est dépendante de son poids moléculaire et sera d'autant plus importante que le poids moléculaire sera élevé. Ainsi lorsque ce test est réalisé avec un ligand de fort poids 20 moléculaire, ayant une forte polarisation de fluorescence intrinsèque, il sera difficile d'apprécier de façon fiable la différence de polarisation de fluorescence entre le ligand libre et le ligand fixé. L'utilisation d'un ligand le plus petit possible permettra au contraire d'exacerber cette différence, et par conséquent d'augmenter la précision de l'essai. Il sera ainsi possible de mieux évaluer la réelle activité d'une molécule, et d'effectuer ces criblages à haut débit.

25 Plus particulièrement, la présente invention concerne le peptide comportant la séquence d'acides aminés de la figure 1 (SEQ ID N°1) ainsi que ses variants fonctionnels.

Par « variants fonctionnels », on entend tous fragments ou mutants ponctuels du peptide décrit dans la figure 1 capables d’interagir avec les protéines Bcl-2 et/ou Bcl-XL.

Ce peptide a été identifié par la méthode du double hybride en utilisant Bcl-XL et Bcl-2 en tant que protéines « appâts ». Trois banques de cDNA humains (placenta, cerveau, lignée cellulaire CEMC7) ont été criblées, et ont permis l’identification de fragments « proies » correspondants à des séquences partielles de la séquence HC21ORF80 (Numéro d’Accession NM_015227).

Il a été ensuite déterminé expérimentalement par la technique du double hybride qu’un fragment de cette séquence est nécessaire et suffisant pour obtenir l’interaction avec Bcl-XL et/ou Bcl-2, et correspond au fragment de 22 acides aminés décrit dans la figure 1.

L’interaction avec les protéines Bcl-2 et Bcl-XL a été validée par des techniques biochimiques (co-immunoprecipitation, GST pull-down) et l’activité biologique de ce peptide a pu être confirmée par transfections et/ou microinjections dans des cellules où il a été montré qu’il induisait l’apoptose.

La présente invention concerne également les séquences d’acides nucléiques déduites selon le code génétique de la séquence d’acides aminés de la figure 1 ainsi que de celles des variants fonctionnels décrits précédemment.

Plus particulièrement, l’invention concerne la séquence d’acide nucléique de la figure 2 (SEQ ID N°2) codant pour le peptide décrit dans la figure 1.

Par « séquences d’acides nucléiques », il doit être compris une séquence nucléique isolée de son contexte naturel. Il s’agit notamment de séquences isolées, amplifiées et/ou purifiées et éventuellement modifiées par génie génétique.

L’invention concerne aussi un vecteur recombinant comprenant une séquence d’acide nucléique selon l’invention.

Par vecteur, il faut comprendre tout type de vecteur permettant l'introduction de la séquence d'acide nucléique dans une cellule-hôte et l'expression du polypeptide.

La vecteur recombinant selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend les séquences d'ADN nécessaires à l'expression des peptides selon l'invention et plus particulièrement du peptide décrit dans la figure 1.

On peut citer en particulier les vecteurs dérivés des plasmides bactériens, les bactériophages, les plasmides et chromosomes de levure, les virus...

L'invention porte aussi sur les cellules-hôtes transformées par les vecteurs recombinants.

Ces cellules sont préférentiellement des bactéries ou des cellules eucaryotes. On peut citer à titre d'exemple *Escherichia coli*, les levures, les cellules d'insectes ou de mammifères.

L'invention porte par ailleurs sur un procédé de criblage d'agents capables de moduler l'interaction entre les peptides selon l'invention et plus particulièrement le peptide décrit dans la figure 1, et des protéines anti-apoptotiques et plus particulièrement Bcl-2 et Bcl-XL. Les agents modulateurs de ces interactions seront avantageusement des molécules synthétisées chimiquement ou issues de banques de produits.

Le procédé de criblage selon l'invention contient les étapes suivantes :

- a) la préparation d'un peptide selon l'invention marqué avec un marqueur de fluorescence ;
- b) l'incubation avec le composé à tester ;
- c) l'ajout de la protéine de fusion contenant la protéine anti-apoptotique ;
- d) la mesure de la polarisation de fluorescence.

L'invention concerne en particulier le procédé de criblage de molécules capables d'inhiber l'interaction entre le peptide et la protéine anti-apoptotique, comprenant les étapes suivantes :

- a) la préparation du peptide selon l'invention marqué avec un marqueur de fluorescence ;
- b) l'incubation ou non avec le composé à tester ;
- c) l'ajout de la protéine de fusion contenant la protéine anti-apoptotique ;
- 5 d) la mesure de la polarisation de fluorescence avec et sans le composé à tester ;
- e) la sélection des molécules pour lesquelles l'augmentation de la polarisation de fluorescence observée avec le composé à tester est significativement inférieure à celle observée sans le composé à tester.

L'invention concerne en particulier le procédé de criblage de molécules capables
10 d'augmenter l'interaction entre le peptide et la protéine anti-apoptotique, comprenant
les étapes suivantes :

- a) la préparation du peptide selon l'invention marqué avec un marqueur de fluorescence ;
- b) l'incubation ou non avec le composé à tester ;
- c) l'ajout de la protéine de fusion contenant la protéine anti-apoptotique ;
- 15 d) la mesure de la polarisation de fluorescence avec et sans le composé à tester ;
- e) la sélection des molécules pour lesquelles l'augmentation de la polarisation de fluorescence observée avec le composé à tester est significativement supérieure à celle observée sans le composé à tester.

20 Selon un mode de réalisation préféré des procédés précédemment décrits, le marqueur de fluorescence sera par exemple Oregon Green, Bodipy ou la fluorescéine, et plus particulièrement la fluorescéine.

Le peptide selon l'invention utilisé dans les procédés de criblage sera préférentiellement le peptide décrit dans la figure 1.

25 Avantageusement, les procédés selon l'invention seront réalisés avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL.

Par conséquent, l'invention porte aussi sur l'utilisation des peptides selon l'invention pour le criblage selon les procédés de l'invention de molécules actives capables de moduler l'apoptose.

Plus particulièrement, l'invention concerne l'utilisation des peptides selon l'invention pour le criblage selon les procédés de l'invention de molécules utiles dans le traitement des pathologies impliquant une dérégulation de l'apoptose.
5

L'invention concerne donc l'utilisation des peptides selon l'invention pour le criblage selon les procédés de l'invention de molécules utiles dans le traitement des maladies autoimmunes, de certaines maladies neurologiques et des cancers.

10 **DESCRIPTION DES FIGURES**

Figure 1 : Séquence d'acides aminés du peptide interagissant avec Bcl-2 et Bcl-XL (SEQ ID N°1)

Figure 2 : Séquence d'acides nucléiques codant pour le peptide décrit dans la figure 1 (SEQ ID N°2)

Les exemples suivants illustrent l'invention et ne la limitent en aucune façon :

EXEMPLE 1 : Identification du peptide décrit dans la figure 1

Trois banques de cDNA humains ont été criblées (placenta, cerveau, lignée cellulaire CEMC7) par la technique du double hybride (Fields et col.) chez la levure en utilisant le protocole de conjugaison (Legrain et col., Nature Genetics, 1997, 16, 277-282).

5
10
15
20
1) *Préparation des « appâts » et « proies »*

a) Les « appâts » utilisés sont : - Bcl-XL délétée de son extrémité C-terminale (1-209) fusionnée au domaine de liaison à l'ADN LexA

- Bcl-2 délétée de son extrémité C-terminale (1-211)

fusionnée au domaine de liaison à l'ADN LexA.

Ils sont exprimés dans *Saccharomyces cerevisiae* (CG1945 ou L40ΔGal4) et mis en préculture à 30°C dans un milieu synthétique dépourvu de tryptophane (DO-Trp) jusqu'à obtention d'une DO_{600nm} comprise entre 0,1 et 0,5. Cinquante ml d'une dilution de cette préculture (DO_{600nm} = 0,006) sont incubés à 30°C pendant une nuit.

b) Une collection de levures contenant les plasmides exprimant les banques de cDNA fusionnés au domaine d'activation de la transcription Gal4 est obtenue par transformation après sélection sur un milieu dépourvu en leucine (DO-Leu). Ces levures sont aliquotées et conservées à -80°C.

2) *Conjugaison*

La conjugaison est réalisée avec un ratio « appât »/« proie » égal à 2.

Une quantité de cellules de « levure-appâts » obtenues au stade 1)a) correspondant à 50 unités DO_{600nm} est mélangée aux « levure-proies » obtenues au stade 1)b). Après centrifugation, le culot est resuspendu dans un milieu YPGlu, étalé sur des boîtes de

culture YPGlu et incubé 4 heures 30 à 30°C. La sélection des levures conjuguées contenant un « appât » et une « proie » capables d'interagir ensembles est réalisée sur un milieu DO-Leu-Trp-His : l'absence de leucine et de tryptophane permet de maintenir une pression de sélection ne permettant qu'aux levures contenant les deux types de plasmides (« appâts »/« proies ») de pousser ; l'absence d'histidine dans le milieu permet de sélectionner les levures conjuguées contenant un plasmide « appât » et un plasmide « proie » capables d'interagir ensembles : cette interaction permet d'activer le gène HIS3 codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'histidine.

5 3) Identification des clones positifs

10 Les fragments « proie » d'une colonie de levures sélectionnées selon 2) sont amplifiés par PCR à partir d'un lysat brut de cette colonie, en utilisant des amorces spécifiques du vecteur « proie » :

ABS1 5'-GCTTGGAATCACTACAGG-3'

ABS2 5'-CACGATGCACGTTGAAGTG-3'.

15 Les produits de PCR sont ensuite séquencés et les séquences obtenues sont identifiées par comparaison avec des banques de données.

Parmi les clones positifs obtenus, des fragments de 300 acides aminés environ ont pu être identifiés comme étant des séquences partielles de la séquence HC21ORF80 (Numéro d'Accession : NM_015227).

20 4) Identification du peptide décrit dans la figure 1

Des expériences de double hybride réalisées selon les stades 1), 2) et 3) précédemment décrits à partir de plus petits fragments de la séquence HC21ORF80 ont permis d'identifier un petit peptide de 22 acides aminés comme étant nécessaire et suffisant pour obtenir l'interaction avec Bcl-XL et Bcl-2 : Asp-Thr-Arg-Arg-Ser-Met-Val-Phe-Ala-Arg-His-Leu-Arg-Glu-Val-Gly-Asp-Glu-Phe-Arg-Ser-Arg.

EXEMPLE 2 : Validation de l'interaction entre le peptide décrit dans l'Exemple 1 et Bcl-2 et/ou Bcl-XL

1) GST « pull-down »

L'interaction entre le peptide obtenu dans l'Exemple 1 et Bcl-2 et/ou Bcl-XL est
5 validée par mesure du déplacement de l'interaction entre une protéine à motif « BH3 »
Bid et la protéine de fusion GST-Bcl-2 ou GST-Bcl-XL.

a) Synthèse de Bid radiomarquée

La protéine marquée est obtenue en utilisant le kit TNT Quick Master (Promega).
Quarante µl de mélange TNT sont incubés pendant 90 minutes à 30°C avec 2 µl
10 (équivalent à 20 µCi) de ³⁵S-méthionine (Amersham), 1 µg d'ADN plasmidique codant
pour Bid et de l'eau en quantité suffisante pour atteindre un volume de 50 µl.

Le nombre de fmoles/ µl de protéine radioactive produite est calculé à partir du nombre
de méthionines dans la protéine.

b) GST « pull-down »

15 Quatre fmoles de protéine Bid radioactivé sont incubées à 4°C pendant 3 heures avec 3
µg de la protéine de fusion glutation-S-transférase-Bcl-XL (GST-Bcl-XL) ou glutation-
S-transférase-Bcl-2 (GST-Bcl-2) ou GST seule dans 300 µl de tampon de liaison (142
mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM tampon Hepes, 0,5 mM DTT, 1 mM EDTA, inhibiteur
de protéases, pH 7,4) et 0,4% de Triton X100. Les billes de « glutathione sepharose 4
20 fast flow » (Amersham) sont lavées 3 fois dans le tampon de liaison et remises en
suspension dans ce tampon de façon à obtenir une solution à 50%. 20 µl sont ajoutés à
chaque échantillon et incubés sous rotation à 4 °C pendant 1 heure. Les billes sont
ensuite lavées 3 fois dans le tampon de liaison, puis 25 µl de tampon 2x SDS, Laemmli
(Sigma) sont ajoutés. Les échantillons sont placés 5 minutes à 95°C puis déposés sur un
25 gel à 12% Tris-Glycine (Invitrogen). Après électrophorèse, le gel est ensuite incubé
dans une solution de séchage (Invitrogen) pendant 30 minutes, puis séché pendant 150
minutes à 70°C. Les protéines radioactives sont révélées par exposition d'un film

Kodak BioMax MS-1 (Sigma). Pour effectuer le test de compétition avec le peptide à tester, celui-ci est ajouté à la solution initiale avec des concentrations allant de 1 à 100 µM.

c) Résultats

Lorsqu'on ajoute à la solution initiale le peptide obtenu dans l'Exemple 1, le signal autoradiographique de Bid disparaît. Ce résultat montre que le peptide obtenu dans l'Exemple 1 inhibe l'interaction entre Bcl-2 et Bid et entre Bcl-XL et Bid.

2) Polarisation de fluorescence

Une solution contenant 1 à 100 nM du peptide obtenu dans l'Exemple 1 marqué à la fluorescéine à l'extrémité N-terminale est mélangée à une solution contenant la protéine de fusion GST-Bcl-XL ou GST-Bcl-2 à la concentration de 0,1 à 1 µM dans un tampon contenant Na₂HPO₄ 20 mM pH 7,4, de l'EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, de l'acide pluronique F-68 0,05%. La polarisation de fluorescence est ensuite mesurée par l'appareil En Vision (Packard Perkin-Elmer).

Résultats : Une augmentation significative de la polarisation de fluorescence est observée lorsque le peptide obtenu dans l'Exemple 1 est incubé avec les protéines de fusion contenant Bcl-XL et Bcl-2 attestant de sa fixation sur ces protéines.

EXAMPLE 3 : Test de criblage de molécules capables d'inhiber l'interaction entre Bcl-2 et/ou Bcl-XL et le peptide obtenu dans l'Exemple 1

Les produits à tester sont distribués dans des plaques 384 puits (Corning Flat Bottom) à une concentration finale de 10 µg/ml. Un puits est rempli avec une quantité équivalente de tampon/solvant sans composé à tester et constituera le témoin. Le peptide obtenu dans l'Exemple 1 marqué à la fluorescéine est ajouté dans chaque puits de manière à obtenir une concentration finale allant de 1 à 100 nM. La protéine de fusion GST-Bcl-XL ou GST-Bcl-2 est ensuite ajoutée de façon à obtenir une concentration finale de 0,1 à 1 µM dans un

tampon contenant Na_2HPO_4 20 mM pH 7,4, de l'EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, de l'acide pluronique F-68 0,05%. La polarisation de fluorescence est ensuite mesurée par l'appareil En Vision (Packard Perkin-Elmer). Une diminution significative de la polarisation de fluorescence enregistrée dans l'essai réalisé avec le composé à tester comparée à celle obtenu sans le composé à tester (puits témoin) permet de conclure à une activité inhibitrice de la molécule. A l'inverse, une augmentation significative de la polarisation de fluorescence dans l'essai avec le produit à tester comparée au témoin permet de conclure à une activité activatrice de la molécule.

REVENDICATIONS

1. Peptide interagissant avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et/ou Bcl-XL caractérisé par la séquence suivante (SEQ ID N°1) : Asp-Thr-Arg-Arg-Ser-Met-Val-Phe-Ala-Arg-His-Leu-Arg-Glu-Val-Gly-Asp-Glu-Phe-Arg-Ser-Arg .
5 2. Peptide caractérisé en ce qu'il correspond à un fragment ou à un mutant ponctuel du peptide selon la revendication 1 et en ce qu'il présente une interaction avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et/ou Bcl-XL .
10 3. Séquence d'acides nucléiques codant un peptide selon la revendication 1 caractérisée par la séquence suivante (SEQ ID N°2) :
5'-GATACCCGTCGCAGCATGGTGTTGCCAGGCACCTGCAGGAGGTGGGAGA
CGAGTTCAGGAGCAGA -3'.
4. Séquences d'acides nucléiques déduites selon le code génétique de la séquence d'acides aminés selon la revendication 1.
15 5. Séquences d'acides nucléiques déduites selon le code génétique de la séquence d'acides aminés selon la revendication 2.
6. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 3 à 5.
20 7. Vecteur recombinant selon la revendication 6 caractérisé en ce que le vecteur est un plasmide comprenant les séquences nécessaires à l'expression du peptide dans une cellule-hôte.
8. Cellule-hôte caractérisée en ce qu'elle est transformée par le vecteur recombinant selon l'une des revendications 6 ou 7.

9. Procédé d'identification de molécules capables de moduler l'interaction entre un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 et une protéine anti-apoptotique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 a) la préparation d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 marqué avec un marqueur de fluorescence ;
- b) l'incubation avec le composé à tester ;
- c) l'ajout de la protéine de fusion contenant la protéine anti-apoptotique ;
- d) la mesure de la polarisation de fluorescence.

10. Procédé d'identification de molécules capables d'inhiber l'interaction entre un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 et une protéine anti-apoptotique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 15 a) la préparation d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 marqué avec un marqueur de fluorescence ;
- b) l'incubation avec ou sans le composé à tester ;
- c) l'ajout de la protéine de fusion contenant la protéine anti-apoptotique ;
- d) la mesure de la polarisation de fluorescence ;
- e) la sélection des molécules pour lesquelles l'augmentation de la polarisation de fluorescence observée avec le composé à tester est significativement inférieure à celle observée sans le composé à tester.

20. Procédé d'identification de molécules capables d'augmenter l'interaction entre un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 et une protéine anti-apoptotique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 25 a) la préparation d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 marqué avec un marqueur de fluorescence ;
- b) l'incubation avec ou sans le composé à tester ;
- c) l'ajout de la protéine de fusion contenant la protéine anti-apoptotique ;
- d) la mesure de la polarisation de fluorescence ;
- e) la sélection des molécules pour lesquelles l'augmentation de la polarisation de fluorescence observée avec le composé à tester est significativement supérieure à celle observée sans le composé à tester.

12. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11 dans lequel le peptide utilisé est caractérisé par la séquence SEQ ID N°1.

13. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11 dans lequel le marqueur de fluorescence utilisé est la fluorescéine.

5 14. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11 dans lequel la protéine anti-apoptotique est Bcl-2 ou Bcl-XL.

15. Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 pour l'identification selon le procédé d'une des revendications 9 à 11 de molécules modulatrices de l'apoptose.

10 16. Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 pour l'identification selon le procédé d'une des revendications 9 à 11 de molécules utiles dans le traitement des pathologies impliquant une dérégulation de l'apoptose.

17. Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 pour l'identification selon le procédé d'une des revendications 9 à 11 de molécules utiles dans le traitement des maladies autoimmunes, de certaines maladies neurologiques et des cancers.

Figure 1 : Séquence d'acides aminés du peptide interagissant avec *Bcl-2* et *Bcl-XL*
(SEQ ID N°1)

Asp-Thr-Arg-Arg-Ser-Met-Val-Phe-Ala-Arg-His-Leu-Arg-Glu-Val-Gly-Asp-Glu-
Phe-Arg-Ser-Arg

Figure 2 : Séquence d'acides nucléiques codant pour le polypeptide décrit dans la figure 1 (SEQ ID N°2)

5'-GATAACCCTCGCAGCATGGTGTTCGCCAGGCACCTGCAGGAGGTGGG
AGACGAGTTCAAGGAGCAGA -3'

LISTE DE SEQUENCES

<110> LES LABORATOIRES SERVIER
HYBRIGENICS

<120> NOUVEAU PEPTIDE INTERAGISSANT AVEC Bcl-XL ET Bcl-2

<130> PEPTIDE-1

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Thr Arg Arg Ser Met Val Phe Ala Arg His Leu Arg Glu Val Gly
1 5 10 15

Asp Glu Phe Arg Ser Arg

20

<210> 2

<211> 66

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

gatacccgtc gcagcatggc gtttgccagg cacctgcggg aggtgggaga cgagttcagg 60
agcaga 66



**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

cerfa
N° 11235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

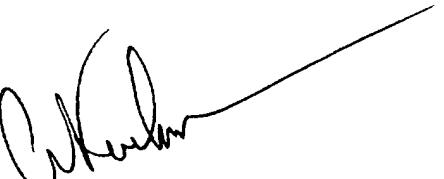
**26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08**
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. . / 2. .

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire.

DB 113 W /260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		PEPTIDE-1
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		03 09 697
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Nouveau peptide interagissant avec Bcl-XL et Bcl-2		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
LES LABORATOIRES SERVIER 12, Place de la Défense 92415 COURBEVOIE Cedex FRANCE		HYBRIGENICS 3-5 Impasse Reille 75014 PARIS FRANCE
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).		
Nom		GENESTE
Prénoms		Olivier
Adresse	Rue	11, rue de la Bénarde
	Code postal et ville	92500 RUEIL MALMAISON
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		HICKMAN
Prénoms		John
Adresse	Rue	136, rue de Tocqueville
	Code postal et ville	75017 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		BENNETT
Prénoms		Richard
Adresse	Rue	3, rue Saint Christophe
	Code postal et ville	75015 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) le 6 août 2003		
Catherine KUEHM-CAUBERE, Ingénieur Brevets		



INSTITUT

NATIONAL DE

LA PROPRIÉTÉ

INDUSTRIELLE

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i>	PEPTIDE-1		
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	03 09 697		
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Nouveau peptide interagissant avec Bcl-XL et Bcl-2			
LE(S) DEMANDEUR(S) : LES LABORATOIRES SERVIER 12, Place de la Défense 92415 COURBEVOIE Cedex FRANCE			
HYBRIGENICS 3-5 Impasse Reille 75014 PARIS FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom RAIN			
Prénoms Jean-Christophe			
Adresse	Rue	32, jardin Boieldieu	
	Code postal et ville	92800	PUTEAUX
Société d'appartenance <i>(facultatif)</i>			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance <i>(facultatif)</i>			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance <i>(facultatif)</i>			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) le 6 août 2003			
Catherine KUEHM-CAUBERE, Ingénieur Brevets			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.